Acta Farm. Bonaerense **21** (2): 119-21 (2002)
Recibido el 7 de diciembre de 2001
Aceptado el 28 de marzo de 2002

Estudio Variacional de Flavonoles en Ejemplares Masculinos y Femeninos de *Smilax campestris* Griseb. -Smilacaceae-

Ana RUGNA*, Alberto GURNI y Marcelo WAGNER

Cátedra de Farmacobotánica, Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Junín 956, (1113) Buenos Aires. República Argentina.

RESUMEN. La producción de metabolitos secundarios de las plantas presenta variaciones estacionales de tipo cuali-cuantitativas. Se plantea como objetivo de este trabajo establecer cómo se modifica la producción de flavonoides en la enredadera dioica *Smilax campestris* Griseb. -Smilacaceae- a lo largo de un año, en individuos femeninos y masculinos. Se emplearon métodos estándares para el aislamiento y la purificación de los compuestos y fue determinada la presencia de tres flavonoles: quercetina, canferol e isoramnetina en forma libre o como glicósido. Las variaciones detectadas durante el ciclo anual en los extractos obtenidos a partir de individuos de ambos sexos fueron de tipo cuantitativo. El mismo tipo de variación se encontró cuando se compararon los ejemplares masculinos con los ejemplares femeninos. El perfil de flavonoles es constante y constituye un punto de partida apropiado para establecer comparaciones con las otras especies del género.

SUMMARY. "Variational Study of Flavonols in Male and Female Specimens of *Smilax campestris* Griseb. -Smilacaceae". Secondary metabolite production in plants can present seasonal quali- or quantitative variations. The aim of this paper is to establish how flavonoid production is modified during a year in male and female specimens of the dioecious twining plant *Smilax campestris* Griseb. -Smilacaceae-. Standard procedures were employed in the isolation, purification and structure determination of the compounds. Three main free or glycosilated flavonols were detected: quercetin, kaempferol and isorhamnetin. Only qualitative variations appeared during the annual cycle of the plant in extracts from male and female specimens. The same kind of variation was found when extracts from male and female specimens were compared with each other. Flavonol profile is constant and so provides a solid starting point to establish phytochemical comparisons with other species of *Smilax.*

INTRODUCCIÓN

Smilax campestris Griseb. -Smilacaceae- es una planta dioica con una distribución geográfica amplia. En la República Argentina se encuentra en las provincias de Jujuy, Salta, Tucumán, Formosa, Chaco, Misiones, Corrientes, Entre Ríos, Santiago del Estero, Córdoba y Santa Fe, hasta el Delta del Río de la Plata en la Provincia de Buenos Aires [1,2]. Su floración es temprana, casi invernal, y ocurre generalmente durante el mes de agosto. Su fruto es una baya negruzca de pulpa dulce. Sus raíces y rizomas fueron utilizados en la medicina folclórica en el tratamiento de la sífilis, el reumatismo y algunas afecciones de la piel; también se describieron usos como diaforética y diurética [2]. Sus hojas y los tallos tiernos se emplearon para la elaboración de bebidas tónicas, amargas y digestivas [2].

La gran variabilidad morfológica y la amplia distribución geográfica que caracteriza esta especie presentan problemas para su correcta identificación. Recientemente Rugna *et al.* [3] analizaron el valor de los flavonoides como marcadores quimiotaxonómicos de la especie. Para completar este análisis y, dado que la producción de metabolitos secundarios de las plantas puede presentar variaciones estacionales, se estudió la producción de flavonoides a lo largo de un año.

El objetivo de este trabajo es establecer có-

PALABRAS CLAVE: *Smilax campestris* Griseb. -Smilacaceae-, Flavonoides, Ciclo anual, Sexualidad.
KEY WORDS: Smilax campestris Griseb. -Smilacaceae-, Flavonoids, Annual cycle, Sexuality.

* Autora a quien dirigir la correspondencia: Correo electrónico: azrugna@huemul.ffyb.uba.ar

mo se modifica la producción de flavonoides en la enredadera dioica *Smilax campestris* Griseb. - Smilacaceae- a lo largo de un año, tanto en individuos femeninos como masculinos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se trabajó con hojas de *S. campestris* provenientes de ejemplares femeninos y masculinos, de Puerto Gaboto, en la Pcia. de Santa Fe. De cada ejemplar se tomaron doce muestras correspondientes a cada mes del año. El ejemplar de herbario está depositado en el Museo de Farmacobotánica "Juan A. Domínguez" (BAF N° 4565).

Métodos

Fueron utilizados 10 g de material seco y molido. La extracción de los compuestos fue realizada a temperatura ambiente, en metanol; el extracto fue concentrado a presión reducida en evaporador rotatorio (concentración 1:1).

Los extractos fueron analizados mediante cromatografía bidimensional en capa fina de celulosa normal (TLC) y de alta resolución (HPTLC). Se utilizó como primera dimensión TBA (Terbutanol - Acido acético -Agua, 3:1:1) y, como segunda dimensión ácido acético al 15%. Los cromatogramas fueron observados a la luz UV antes y después de ser expuestos a vapores de amoníaco. También se realizó una aspersión con tricloruro de aluminio en metanol (solución al 5%) y con el reactivo AEDBE (Naturstoffreagenz A), para obtener el patrón de distribución de los compuestos en el material estudiado.

El aislamiento, la purificación y la caracterización de los compuestos fueron llevados a cabo por cromatografía descendente en papel Whatman 3MM y en columnas de celulosa microcristalina [4-6]. Se tomaron 2 ml de extracto y se lo sometió a una hidrólisis ácida con una solución acuosa de ácido clorhídrico 2 N (HCl 2 N) durante 1 h a 100°C, para estudiar los aglicones y los azúcares [4].

Los azúcares fueron cromatografiados en capa delgada con sustancias de referencia [7] como glucosa y ramnosa, entre otras.

RESULTADOS

En base a los estudios realizados sobre las hojas de ejemplares femeninos y masculinos de *S. campestris* pudo determinarse la presencia de tres flavonoles: quercetina, canferol e isoramnetina en forma libre o como glicósidos, según se detalla en la tabla 1.

	Compuestos					
Ejemplar	**Q**	**C**	**I**	**Q3Rt**	**C3Rt**	**I3Rt**
Femenino	+++	++	+	+++	+	++
Masculino	++	+	+	++	+	+

Tabla 1. Compuestos determinados. Q: Quercetina; Q3Rt: Rutina; C: Canferol; C3Rt: Canferol-3-O-rutinósido; I: Isoramnetina; I3Rt: Isoramnetina-3-O-rutinósido. +: presencia; ++: presente abundantemente; +++: alta concentración.

En lo concerniente al sexo, la concentración en los ejemplares femeninos de los flavonoides fue mayor que en los masculinos. La floración, en ambos sexos, es el estado fenológico que presentó mayor concentración de flavonoles con respecto a los demás estados.

Las propiedades físico-químicas de los compuestos se describen a continuación.

Canferol. Rf en Forestal 0,42, en BAA (n-Butanol - Ácido acético - Agua, 6:1:2) 0,83, en CAA (Cloroformo - Ácido acético - Agua, 2:1:saturación) 0,42, en TBA 0,80 y en HOAc 60% 0,43. Propiedades espectrales $\lambda_{máx}$ MeOH nm: 266, 368; + NaOMe 278, 416; + $AlCl_3$ 268, 420 y + HCl 268, 420; + NaOAc 274, 386 y + H_3BO_3 266, 370.

Quercetina. Rf en Forestal 0,42, en BAA 0,73, en CAA 0,11, en TBA 0,53, en HOAc 60% 0,23. Propiedades espectrales: $\lambda_{máx}$ MeOH nm: 256, 370; + NaOMe 248, 322 (desc.); + $AlCl_3$ 270, 334, 456 y + HCl 265, 360, 426; + NaOAc 274, 390 (desc.) y + H_3BO_3 262, 388.

Isoramnetina. Rf en Forestal 0,71, en BAA 0,91, en CAA 0,61, en TBA 0,86, en HOAc 60% 0,54. Propiedades espectrales: $\lambda_{máx}$ MeOH nm: 253, 370; + NaOMe 240, 436 (desc); + $AlCl_3$ 264, 431 y + HCl 262, 358, 428; + NaOAc 274, 320, 390 (desc.) y + H_3BO_3 254, 378.

Canferol-3-O-rutinósido. Rf en BAA 0,65, en H_2O 0,32, en TBA 0,70. Propiedades espectrales: $\lambda_{máx}$ MeOH 266, 350; + NaOMe 274, 398; + $AlCl_3$ 274, 348, 394 y + HCl 276, 346, 394; + NaOAc 274, 388 y + H_3BO_3 266, 270, 352. Productos de hidrólisis: Canferol, glucosa y ramnosa.

Quercetina-3-O-glucósido. Rf en BAA 0,59, en H_2O 0,09, en HOAc 15% 0,39. Propiedades espectrales: $\lambda_{máx}$ MeOH 256, 358; + NaOMe 272, 410; + $AlCl_3$ 270, 402 y + HCl 270, 382; + NaOAc 266, 380 y + H_3BO_3 264, 380. Productos de hidrólisis: quercetina y glucosa.

Quercetina-3-O-rutinósido. Rf en BAA 0,56, en H_2O 0,30, en HOAc 60% 0,60 y en TBA 0,60. Propiedades espectrales: $\lambda_{máx}$ MeOH 258, 264, 358; + NaOMe 272, 330, 410; + $AlCl_3$ 274, 430 y + HCl 272, 362, 400; + NaOAc 272, 406 y + H_3BO_3 262, 378. Productos de hidrólisis: quercetina, glucosa y ramnosa.

Quercetina-3-O-ramnogalactoglucósido. Rf en BAA 0,72, en H_2O 0,59, en HOAc 60% 0,68 y en TBA 0,75. Propiedades espectrales: $\lambda_{máx}$ MeOH 254, 264, 350; + NaOMe 270, 324, 400; + AlCl3 272, 354, 400 y + HCl 272, 352, 398; + NaOAc 272, 325, 396 y + H_3BO_3 260, 300, 380. Productos de hidrólisis: quercetina, glucosa, ramnosa y galactosa.

Isoramnetina-3-O-rutinósido. Rf en BAA 0,66, en H_2O 0,39, en HOAc 60% 0,72 y en TBA 0,70, Propiedades espectrales: $\lambda_{máx}$ MeOH 256, 266s, 356; + NaOMe 270, 328, 410; + AlCl3 268, 368, 404 y + HCl 268, 272s, 362, 400; + NaOAc 270, 324, 406 y + H_3BO_3 258, 304, 362. Productos de hidrólisis: isoramnetina, glucosa y ramnosa.

CONCLUSIONES

Las concentraciones de los flavonoides determinados en ejemplares femeninos fueron superiores a las halladas en los ejemplares masculinos. El modelo de los flavonoles detectados es el mismo en ambos ejemplares.

Al comparar los ejemplares femeninos y masculinos entre sí no se detectaron variaciones cualitativas a lo largo del año. En ambos sexos, los niveles de flavonoles eran superiores en el momento de la floración con respecto al resto del ciclo, lo que evidencia un aumento de la actividad metabólica durante la floración.

La producción de los flavonoles es estable independientemente de la época del año y de la dioecia de la especie. Las diferencias detectadas son sólo de tipo cuantitativo, lo que sugiere constancia y estabilidad con respecto a su metabolismo.

El perfil de flavonoles constante constituye un punto de partida apropiado para establecer comparaciones con las otras especies del género *Smilax* y pueden, por lo tanto, resultar marcadores quimiotaxonómicos apropidados.

De acuerdo con los resultados obtenidos, los flavonoides de *S. campestris* también resultarían útiles para garantizar la calidad de la droga cuando es empleada en medicina popular.

Agradecimientos. A la Prof. Dra. Susana Gattuso, quien aportó y determinó el material estudiado, y a la Universidad de Buenos Aires por la provisión del subsidio TB038, que financia este estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Guaglianone, R. & S. Gattuso (1991) *Bol. Soc. Arg. de Botánica* **27**: 105-29
2. Mandrile E.L. & G. Bongiorno de Pfirter (1991) *Bifase* **6** (4).
3. Rugna, A.Z., A.A Gurni & M.L. Wagner (1999) *Acta Horticulturae* **501**:191-3.
4. Mabry T.J., K.R Markham & M.B. Thomas (1970) *"The Systematic Identification of the Flavonoids"*. Springer-Verlag, Berlin and New York, págs. 1-175.
5. Markham, K.R. (1982) *"Tecniques of Flavonoids Identification"*, Academic Press Ed., New York: págs. 1-113.
6. Waterman P.G. & S. Mole (1994) *"Analysis of Phenolic Plant Metabolites"*, Blackwell Scientific Publication, Oxford: págs. 1-238.
7. Hansen, S.A. (1975) *J. Chromatog.* **107**: 224-6.